

УДК 576.893.192 : 595.729

**ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА ЖИРОВОГО ТЕЛА СВЕРЧКА
GRYLLUS BIMACULATUS (GRYLLIDAE) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ
ADELINA GRYLLI (SPOROZOA: ADELEINA)**

© Г. Г. Паскерова, Ю. Я. Соколова, А. А. Добровольский

Исследованы особенности патогенеза жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* при кокцидиозе, вызванном *Adelina grylli*, с помощью гистохимических и электронно-микроскопических методик. Результаты исследования показали: 1) резкое исчезновение гликогена из инвазированных клеток хозяина на ранних стадиях заражения при одновременном накоплении углеводов паразитом; 2) постепенное исчезновение жировых гранул из цитоплазмы инфицированных клеток; 3) инфильтрацию жирового тела гемоцитами и образование меланизированных капсул вокруг ооцист.

Аделеидные кокцидии (подотряд *Adeleina* Leger, 1911) входят в состав одного из трех подотрядов отряда *Eucoccidiida* Leger et Lubosq, 1910 кл. *Sporozoa* Leuckart, 1879. Гомоксенные аделеидные кокцидии, к которым относится объект нашего исследования *Adelina grylli*, являются облигатными внутриклеточными паразитами беспозвоночных, в жизненном цикле которых закономерно чередуются процессы пролиферации и дифференцировки. Одновременно с этим закономерно меняется и характер клеточного взаимодействия между паразитом и хозяином. Изучение этих процессов приобретает особый интерес в связи с тем, что они осуществляются на фоне малоизученных защитных реакций организма хозяина.

Исследуемый вид *Adelina grylli* паразитирует в клетках жирового тела сверчка *Gryllus bimaculatus*. Жизненный цикл этого паразита включает в себя чередование подвижных расселительных стадий, способных к перемещению в межклеточной среде и к проникновению в клетки хозяина, и неподвижных, находящихся на фазах роста, пролиферации и дифференцировки (Бутаева, 1996а, 1996б, 1996в, 1996г, 1996д).

Настоящая статья является предварительным сообщением, посвященным результатам гистохимического и электронно-микроскопического исследования влияния кокцидии *Adellina grylli* на динамику содержания липидов и резервных углеводов в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Основой лабораторной культуры стали сверчки *Gryllus bimaculatus* из популяций, поддерживаемых в инсектарии ИЭФиБ им. И. М. Сеченова РАН. Насекомых содержали по методу Князева (1985).

Для выведения культуры сверчков, свободных от заражения, из исходной культуры отбирали синхронно отложенные яйца, тщательно промывали их в дистиллированной воде, переносили на стерильный субстрат и помещали в стандартные условия содержания насекомых.

Заражению подвергались личинки 2—3-го личиночных возрастов. Считается, что в этом возрасте насекомые являются наиболее восприимчивыми к инфекции. Источником инвазии служили сверчки из спонтанно зараженной культуры инсек-

Таблица 1

Динамика содержания липидов
в жировом теле сверчков
Gryllus bimaculatus,
зараженном кокцидией *Adelina grylli*
Table 1. Dynamics of lipid contents
in a fat body of *Gryllus bimaculatus*
unfected with *Adelina grylli*

Возраст сверчков	Интенсивность инвазии		
	контроль	средняя	высокая
Протонимфа	+++ (5)	++ (5)	+ (3)
Дейтонимфа	+++ (5)	++ (6)	+ (5)
Имаго	+++ (3)	++ (5)	+— (2)

Примечание. Знаки «+» и «—» означают присутствие или отсутствие жира в клетках хозяина. Количество знаков «+» — обилие содержания жира. В скобках — количество исследованных особей.

Таблица 2

Динамика содержания гликогена
в жировом теле сверчков
Gryllus bimaculatus,
зараженном кокцидией *Adelina grylli*
Table 2. Dynamics of glycogen contents
in a fat body of *Gryllus bimaculatus*
unfected with *Adelina grylli*

Возраст сверчков	Интенсивность инвазии		
	контроль	средняя	высокая
Протонимфа	+ (5)	— (5)	— (3)
Дейтонимфа	+ (5)	— (6)	— (5)
Имаго	+ (5)	— (5)	— (2)

Примечание. Знаки «+» и «—» означают присутствие или отсутствие гликогена в клетках хозяина. В скобках — количество исследованных особей.

тария ИЭФиБ, содержащие массу зрелых ооцист. Вскрытых сверчков помещали в культуру свободных от паразита личинок.

По мере развития личинок производили отбор самок на стадии протонимфы, дейтонимфы и 7-дневного имаго как из экспериментально зараженной культуры, так и из контрольной — свободной от инвазии. Интенсивность инвазии оценивали микроскопированием препаратов жирового тела.

Гистохимические исследования липидов и углеводов жирового тела проводили на свежемороженых срезах нефиксированной ткани. Срезы изготавливали в криостате фирмы «Bright». Замораживание ткани проводили на тканедержателе. В качестве замораживающей среды был использован жидкий азот. Изготовление срезов проводили при температуре -16° стальным ножом. Толщина срезов 10 мкм.

Для выявления липидов был использован метод гистохимической окраски красным шарлахом, для выявления углеводов — реакция ШИК (Роскин, Левинсон, 1957). Для контроля реакции использовали обработку препаратов слюной при температуре 37° .

Результаты анализа препаратов представлены в табл. 1 и 2. Все светооптические исследования проводили с помощью микроскопов «Jenaval» и МБИ-15 (фазово-контрастный режим). С их же помощью были изготовлены фотографии.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки незараженного и инвазированного жирового тела фиксировали в течение 2 ч в 2%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М какодилатном буфере, pH 7.2. После 1-часовой промывки в нескольких сменах того же буфера кусочки фиксировали в течение 1 ч в 1%-ном растворе OsO_4 . Все этапы фиксации проводили при 4° . После обезвоживания в этаноле с возрастающей концентрацией и ацетоне объект заключали в смесь эпон-812 и аралдита. Окрашивали полутонкие срезы метиленовым синим по стандартной методике. Контрастировали ультратонкие срезы растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Материал изучали с помощью электронного микроскопа «Hitachi 300».

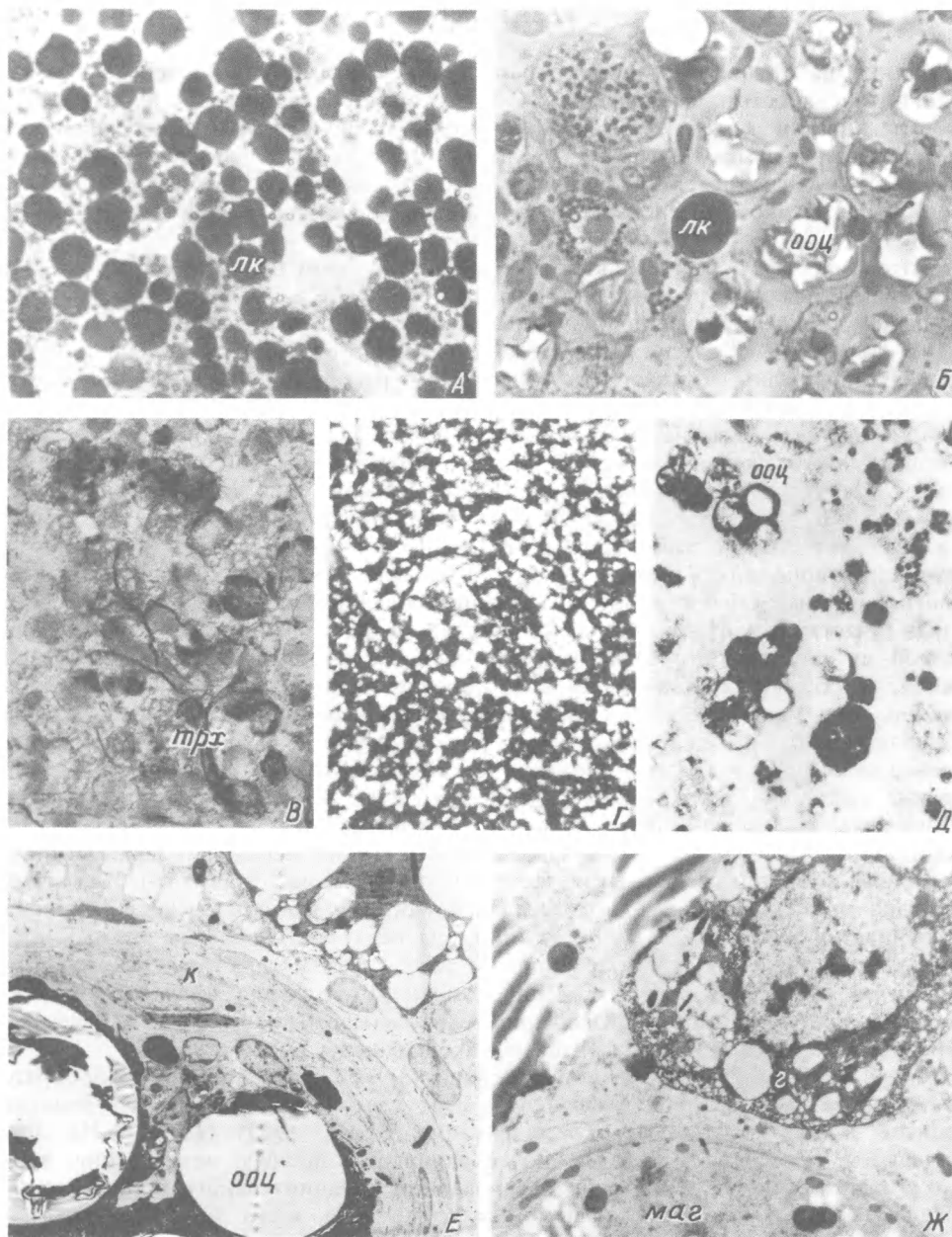
РЕЗУЛЬТАТЫ

Личинки на стадии протонимфы, как правило, заражены кокцидиями с невысокой интенсивностью, в то время как у дейтонимф и собственно имаго интенсивность инвазии может быть крайне высока. При невысокой интенсивности заражения сохраняются большие участки интактной ткани. Очаги инвазии обычно локализуются вдоль трахейных путей, пронизывающих доли жирового тела (см. рисунок). При высокой интенсивности инвазии — свободные от паразитов участки невелики.

Гистологическая окраска криостатных срезов красным шарлахом показала, что незараженные сверчки перечисленных возрастов имели нормальное жировое тело с большим количеством липидных капель, равномерно распределенных по всему объему органа (А). Размер жировых капель варьирует. Небольшие капли чаще всего сгруппированы в кластеры, крупные — распределены более или менее равномерно. Однако это не мешает анализу количества жира в ткани по интенсивности окраски. При невысокой инвазии кокцидией *Adelina grylli* у сверчков на стадии прото-, дейтонимфы и 7-дневного имаго наблюдается явное снижение общего количества жира. Размер липидных капель уменьшается. Нарушается равномерность распределения жировых включений по долям органа. В местах расположения очага инвазии жир может полностью отсутствовать (Б). Это особенно характерно для «старых» очагов, в которых вокруг заканчивающих свое развитие цистных стадий возникают меланизированные капсулы. В неинфицированных участках жирового тела количество жира соответствует норме. При высокой интенсивности инвазии участки ткани, свободной от паразитов, уменьшаются, и общее содержание жира в жировом теле также сильно снижается. Наконец, жир может исчезнуть полностью во всем органе. Подобное заражение мы наблюдали только в одном случае — у самки-имаго недельного возраста, когда жировое тело было полностью поражено кокцидиями. В этом случае очень мелкие жировые капли выявляются лишь в самих паразитах — шизонтах и спороцистах.

Углеводы в жировом теле насекомых откладываются в виде гликогена. У незараженных сверчков он диффузно располагается по периферии адипоцитов и в центральной части клеток выявляется в виде оформленных гранул (Г). У сверчков на стадии прото-, дейтонимфы и недельной самки-имаго при средней интенсивности инвазии кокцидией *Adelina grylli*, когда остаются свободные от паразитов значительные по объему участки жирового тела, гранулы гликогена в цитоплазме адипоцитов полностью исчезают. При этом гликоген всегда выявляется у всех паразитов, кроме мерозоитов. Особенно велико содержание резервных углеводов в цитоплазме созревающих шизонтов и макрогамонтов (Д).

Вокруг цистных стадий (ооциста, спороциста) кокцидий *Adelina grylli* образуются мощные многослойные оболочки за счет клеток гемолимфы: гранулоцитов, эноцитов и плазмоцитов (по классификации Beard, 1953) (Е, Ж). Их ядра уплощаются, клетки вытягиваются. Далее начинается процесс меланизации, ведущий к образованию жесткой пигментированной соединительнотканной капсулы. Цистные стадии, находящиеся внутри капсул, чаще всего не подавляются и сохраняют инвазионность. Спорозоиты зачастую успевают выйти из спороцисты и мигрируют через еще «мягкие» (немеланизированные или слабомеланизированные) стенки формирующейся капсулы. Часто на препаратах можно наблюдать капсулы вокруг ооцист с освободившимися от спорозоитов спороцистами. Однако в ряде случаев при небольшой интенсивности инвазии удалось наблюдать развитие мощных капсул, вызывающих гибель паразитов. В этом случае в жировом теле можно наблюдать довольно крупные пигментированные островки, в некоторых остаются пустоты — места поселения погибших паразитов. Капсулы, по нашим наблюдениям, не образуются вокруг меронтов и молодых половых шизонтов. Они начинают формироваться лишь вокруг зрелых макрогамонтов, трансформирующихся в дальнейшем в зрелые ооцисты.



Патогенез жирового тела *Gryllus bimaculatus* при кокцидиозе.

А, Г — участки intactного жирового тела; Б, В, Д — участки зараженного жирового тела (А: криостатный срез, «Jenaval», $\times 20$; Б: криостатный срез, «Jenaval», $\times 40$; В: ФК МБИ-15, $\times 20$; Г: ШИК реакция, «Jenaval», $\times 12.5$; Д: ШИК реакция, «Jenaval», $\times 12.5$). Е: многослойная капсула вокруг паразита (ТЕМ, $\times 3000$); Ж: инфильтрация жирового тела гемоцитами при кокцидиозе (ТЕМ, $\times 4000$). г — гемоцит; к — капсула; лк — липидные капли; маг — макрофаг; ооц — ооциста со спороцистами; трх — трахея.

Pathogenesis of a fat body of *Gryllus bimaculatus* with the coccidiosis.

ОБСУЖДЕНИЕ

Жировое тело насекомых служит местом накопления запасных веществ — липидов, белков и углеводов (Тыщенко, 1976). Эти энергетические запасы на стадии личинки необходимы для осуществления роста и линьки насекомых, а на стадии имаго — для развития яичников и размножения. В данной работе мы использовали сверчков в предлиночный период, когда в их организме происходит накопление веществ разной природы (резервные, продукты метаболизма и т. д.), и 7-дневных имаго, у которых яичники завершили свое развитие.

По данным Бутаевой (1996а), интенсивность инвазии большинства особей спонтанно зараженных культур крайне высока и может быть практически одинаковой у имаго и личинок, начиная с 4-го возраста. В личинках 1—3-го возрастов выявить кокцидий обычно не удастся. Вероятно, паразиты успевают пройти в личинках младших возрастов лишь самые ранние этапы своего развития, которые еще не могут обеспечить высокую интенсивность заражения.

Нам показалось целесообразным исследовать экспериментально зараженных личинок на стадии прото-, дейтонимфы и имаго, когда кокцидиоз достаточно развился.

Проанализировав гистологические препараты, мы можем с уверенностью говорить об «очаговом» распределении паразитов в жировом теле, что согласуется с данными Бутаевой (1996а). Интенсивно зараженные участки чередуются с неинфицированной тканью. При этом наблюдается тенденция поселения кокцидий вдоль трахейных путей, что, вероятно, связано с аэробным типом метаболизма паразита.

Криостатные срезы здоровых личинок-самок на стадии прото-, дейтонимфы и имаго-самок показали, что жировое тело богато жирами и углеводами. При развитии кокцидиоза у сверчков тех же возрастов наблюдается плавное уменьшение содержания липидов (табл. 1) и резкое снижение количества гликогена в жировом теле (табл. 2). Но за счет действия компенсаторных механизмов в незараженных участках сохраняется достаточно высокое содержание этих веществ, и, вероятно, поддерживается относительно нормальное функциональное состояние.

Резкое исчезновение гликогена из жирового тела сверчков может быть связано с переключением метаболизма зараженной ткани на анаэробный путь обмена, а также с общим усилением процессов катаболизма в зараженной клетке для обеспечения энергией развивающихся паразитов. Возможно, имеет место непосредственное поглощение углеводов хозяина паразитом. Гликоген наиболее интенсивно выявляется в созревающих шизонтах и макрогамонтах.

Более энергоемкая утилизация жиров происходит постепенно. Жиры как источник энергии обеспечивают функционирование организма хозяина, а также потребности паразита. Об активном аэробном расщеплении жиров, идущем по крайней мере у зоитов и гамонтов, в какой-то степени может свидетельствовать выявленная высокая активность сукцинатдегидрогеназы (Бутаева, 1996а). Косвенным доказательством наличия аэробного метаболизма является также преимущественная локализация паразитов (гамонтов и ооцист) в непосредственной близости от трахей и трахеол. Паразит также накапливает жиры, природа которых до сих пор неизвестна (резервы ли это или продукты метаболизма).

Известно, что внутриклеточные стадии развития *Adelina grylli* (Бутаева, 1996а, 1996б, 1996в, 1996г, 1996д) строят свои взаимоотношения с клеткой хозяина так, чтобы последняя длительное время сохраняла свою структурную и функциональную целостность. Это относится к зоитам, молодым шизонтам, созревающим гамонтам. За пределами паразитофорной вакуоли, в которой располагается паразит, клетка хозяина сохраняет нормальное строение и может, вероятно, по-прежнему справляться со своими многочисленными функциями, в том числе и с накоплением резервных веществ. По мере роста и развития паразита, особенно вступившего на путь пролиферации (меронты, цистные стадии), в адипоците усиливаются дегенеративные изменения.

Отношения между паразитом и хозяином резко меняются на стадии сизигия и последующих цистных стадий. Сохранение целостности клетки хозяина для паразита уже не является актуальным. Участки жировой ткани, зараженные цистными стадиями, утрачивают нормальную клеточную структуру. Развитие самого паразита на этом этапе происходит за счет резервов, накопленных на стадии макрогаметы. Начиная со стадии зиготы паразит фактически перестает быть внутриклеточным. В этот момент вокруг него и начинается формироваться соединительнотканная капсула. Последняя является многоклеточным образованием, построенным из защитных клеток гемолимфы.

На электронно-микроскопическом и на светооптическом уровнях значительное количество гемоцитов выявляется в непосредственной близости от инфицированных клеток с развивающимися паразитами (Ж). Многие из них могут быть идентифицированы как эноциты или цистоциты, так как они содержат кристаллические включения, заключенные в крупные вакуоли. Предполагается, что эноцитоподобные гемоциты являются основным источником тирозина, которые под действием фенолоксидазы превращаются в меланин (Тыщенко, 1976). По-видимому, именно они участвуют в процессах меланизации капсул. Клеточные капсулы вокруг зрелых ооцист формируются плазмцитоподобными клетками. В конце своего развития зрелые ооцисты окружаются толстыми капсулами из нескольких слоев уплощенных гемоцитов, сцементированных меланинами. Остается непонятным, является ли подобная гемоцитарная реакция естественным защитным механизмом, инактивирующим и убивающим инкапсулированные ооцисты, или же это инвертированная реакция, индуцируемая паразитом, дающая ему возможность избежать воздействия литических ферментов и дожидаться благоприятных условий для возобновления развития. Наши исследования пока не дают однозначного ответа на этот вопрос. Однако большинство исследователей (Moroff, 1907; Yarwood, 1937; Weiser, Beards, 1959) приходят к выводу, что цисты не разрушаются внутри таких многослойных оболочек. А также считается, что аделины секретируют некий метаболит на конечных этапах спорогонии или сразу после образования сизигия, который стимулирует иммунный ответ и приводит к образованию многослойных меланизированных капсул вокруг ооцист.

В заключение следует отметить, что влияние, оказываемое гомоксенными аделеидными кокцидиями на особь хозяина, почти не изучено. Из литературных данных известно, что даже при очень высокой интенсивности инвазии ни внешний вид, ни поведение, ни некоторые физиологические особенности беспозвоночного хозяина не подвергаются очевидным изменениям (Бутаева, 1996а; Листов, 1980; Hauschka, 1943; Malone, Dhana, 1988; Yarwood, 1937). Это позволяет предполагать, что воздействие гомоксенных аделеин на беспозвоночного хозяина характеризуется отсутствием острого патогенного эффекта. Наши данные не противоречат этому выводу, хотя при очень сильном заражении жировое тело в значительной мере утрачивает свою резервную функцию.

Данная работа является лишь первым этапом в исследовании особенностей патогенеза насекомых при заражении аделеидными кокцидиями. Работа поддержана грантом 97-04-48 985.

Список литературы

- Бутаева Ф. Г. Жизненный цикл, цитологические и цитохимические особенности *Adelina grylli* Butaeva, 1996 (Apicomplexa, Eucoccidiida, Adeleidae): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1996а. 21 с.
- Бутаева Ф. Г. *Adelina grylli* sp. n. (Sporozoa, Adelina) из сверчка *Gryllus bimaculatus* // Паразитология, 1996б. Т. 30, вып. 1. С. 64—69.
- Бутаева Ф. Г. Электронно-микроскопическое исследование кокцидии *Adelina grylli* Butaeva, 1996 (Sporozoa, Adeleina). I. Подвижные расселительные стадии // Цитология, 1996в. Т. 38, вып. 9. С. 904—907.

- Бутаева Ф. Г. Электронно-микроскопическое исследование кокцидии *Adelina grylli* Butaeva, 1996 (Sporozoa, Adeleina). II. Молодые шизонты // Цитология, 1996г. Т. 38, вып. 9. С. 908—911.
- Бутаева Ф. Г. Электронно-микроскопическое исследование кокцидии *Adelina grylli* Butaeva, 1996 (Sporozoa, Adeleina). III. Макрогамонт (женский гамонт), псевдосизигий // Цитология, 1996д. Т. 38, вып. 9. С. 912—915.
- Князев А. И. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтومол. обозр. 1985. Т. 64, № 1. С. 58—73.
- Листов Н. Устойчивость личинок малых хрущаков к бромметилу в связи с их заражением микроспоридиями и кокцидиями *Adelina tribolii* // Энтومол. обозр. 1980. Т. 59, № 3. С. 725—729.
- Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. М.: Сов. наука, 1957. 466 с.
- Тыщенко В. П. Основы физиологии насекомых. Ч. 1. Физиология метаболических систем. Л.: Изд-во ЛГУ, 1976. 363 с.
- Beard L. M. Circulation // Insect physiology. N. Y., 1953. P. 232—272.
- Hauschka T. S. Life history and chromosome cycle of the coccidian *Adelina deronis* // J. Morphol. 1943. Vol. 73. P. 529—582.
- Malone L. F., Dhana S. Life cycle and ultrastructure of *Adelina terebrionis* (Sporozoa, Adeleidae) from *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae) // Parasitol. Res. 1988. Vol. 74. P. 201—207.
- Moroff T. Untersuchungen über Coccidien: I. *Adelea zonula* n. sp. // Arch. Protistenk. 1907. Bd 8. S. 17—51.
- Weiser J., Beard R. L. *Adelina sericesthis* n. sp., a new coccidian parasite of scarabaeid larvae // J. Insect Pathol. 1959. Vol. 1. P. 99—106.
- Yarwood E. F. The life cycle of *Adelina cryptocerci* sp. nov., a coccidian parasite of the roach *Cryptocercus punctulatus* // Parasitology. 1937. Vol. 29. P. 370—390.

СПбГу, Санкт-Петербург, 199034;
ВИЗР, Пушкин—8, 189620

Поступила 10.01.1998

PECULIARITIES OF PATHOGENESIS OF A FAT BODY IN THE CRICKET *GRYLLUS BIMACULATUS* (GRYLLIDAE) INFECTED WITH *ADELINA GRYLLI* (SPOROZOA: ADELEINA)

G. G. Paskerova, Yu. Ya. Sokolova, A. A. Dobrovolsky

Key words: *Gryllus bimaculatus*, fat body, pathogenesis, *Adelina grylli*, Adeleina.

SUMMARY

Peculiarities of pathogenesis of *Gryllus bimaculatus* fat body infected with *Adelina grylli* were investigated by means of histochemical methods and electron microscopy. The obtained results revealed the following.

1. Abrupt disappearance of glycogen from parasitized host cells, which takes place already at early stages of infection and is accompanied by accumulation of glycogen by parasites.
2. Gradual disappearance of fat drops from cytoplasm of infected cells, complete disappearance of fat drops being observed only if the tissue is filled with cyst stages and its integrity is actually destroyed.
3. The pathogenesis of insect coccidiose is closely connected with extraordinary hemocyte reaction of the host, apparently induced by parasites. Such a reaction results in the infiltration of the fat body with hemocytes and formation of melanized capsules around oocytes. In fact the activation of the hemocyte reaction is the transition from intracellular parasitism to the tissue one.